

## トリカブト毒に関する裁判化学的・臨床薬学的研究

著者	伊藤 鍛
号	436
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15602">http://hdl.handle.net/10097/15602</a>

氏 名 (本籍)                    <sup>い</sup>伊                    <sup>とう</sup>藤                    <sup>きたえ</sup>鍛

学 位 の 種 類                    博                    士 (薬                    学)

学 位 記 番 号                    薬                    第                    4 3 6                    号

学位授与年月日                    平 成 13 年 3 月 2 日

学位授与の要件                    学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目                    トリカブト毒に関する裁判化学的・臨床薬学  
的研究

論文審査委員                    (主 査)  
教授 水 柿 道 直                    教授 後 藤 順 一  
教授 山 添                    康

# 論文内容要旨

## 【目的】

キンポウゲ科のトリカブトは著名な有毒植物であり、その矢毒への使用は旧石器時代から始まっていると推定されている。トリカブトはその猛毒性ゆえ、一般民衆の誤食等の中毒事故事例が存在するのみならず、洋の東西を問わず要人の暗殺等、政治的謀略にも用いられてきた経緯があり、それらの記録は数多くの史書に残っている。

トリカブト毒の本質は、アコニチンに代表されるアコニチン系アルカロイド（アコニチン類）であり、アコニチンの他にメサコニチン、ヒパコニチンおよびジェサコニチン等が存在する。アコニチンのヒト経口致死量は1ないし2 mgであると報告されており、植物由来化学成分のなかで最も毒性の強い成分とされる。

これらアコニチン類は、神経細胞膜に存在するナトリウムイオンチャンネルのゲート機構に作用して膜電位依存性を過分極側に移動させる。このため中毒時の主な臨床症状としては麻痺、不整脈等の症状がみられる。不整脈は心室細動等、致命的なものに移行し、最悪の場合は、心臓、呼吸停止が発現し死の転帰をたどる。

現代でもトリカブト毒に起因する中毒事故は散発しているが、中毒事故が発生した場合、臨床的には適切な治療を行う上で中毒起因物質の同定・定量が必須となる。一方、殺人あるいは自殺の事例など、中毒に事件性が疑われる場合は、裁判化学的に中毒起因物質の同定・定量が不可欠となる。

前述のようにアコニチン類は極めて微量で毒性を発現するため、中毒患者体液中の本アルカロイド濃度は極めて低い。従って、トリカブト中毒患者体液からアコニチン系アルカロイドを定量する場合、従来法は感度および特異性の点で不十分である。そのため、トリカブトを用いた殺人は証拠に残らない殺人方法とされていた。このような背景で特に裁判化学分野から、トリカブト中毒事例における生体試料中アコニチン系アルカロイドの同定および定量法の開発が待たれていた。

そこで、本研究では、上記の問題点を背景として測定感度および化合物特異性にきわめて優れるガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー（GC/MS）を用い、(A) トリカブトを用いた犯罪への対応とその抑止への応用および (B) 誤食や自殺企図の際の原因物質の同定とそれに対する適切な処置への応用を目的として、トリカブト毒に関し裁判化学的および臨床薬学的視点から以下の検討を加えた。

すなわち、最初に、①トリカブト属植物中の毒含有量について知見を得る目的で高分析精度を有するガスクロマトグラフィー－セレクトッドイオンモニタリング（GC-SIM）を用い、ジェステル型アコニチン系アルカロイドの定量法を確立した。そして、各季節ごとに採取したトリカブト塊根中のジェステル型アコニチン系アルカロイドを定量し、毒含有量の季節変動について検討した。また、②トリカブト毒の体内動態解明を目的として、ジェステル型アコニチン系アルカロイドとそれらの加水分解体について生体試料中からの超微量一斉定量法を確立した。さらに、③トリカブト根塊抽出液摂取で自殺を図った患者の、経時的に採取した血液および尿試料を分析し、アコニチン系アルカロイドの体内動態について検討を加えた。

## 【方法】

### 1. GC/MS測定条件

VandenBergのソルベントレス注入装置を装着した日本電子製DX-303型GC/MS装置に、データ処理装置DA-5000を連結した。GC/MSはEI (Electron Impact) 法で、イオン源温：250℃、イオン化電圧：70 eV、トラップ電流：300  $\mu$  A、加速電圧：3 kVの条件で行った。ガスクロマトグラフィーは、DB-5化学結合型溶解シリカキャピラリーカラム15 m  $\times$  0.25 mm i.d. (J&W Scientific社)を使用し、250℃から320℃まで16℃/minの昇温条件で行った。

### 2. GC/SIMでの各アコニチン系アルカロイドのモニタリングイオン

ヒパコニチンはmono trimethylsilyl (TMS) エーテル誘導体、メサコニチン、アコニチン及びジェサコニチンはbis TMSエーテル誘導体から得られる基準ピーク ( $[M-CH_2COOH-OCH_3]^+$ イオン)である  $m/z$  596, 684, 698及び728をモニタリングイオンとして、それぞれ使用した。アコニン及びメサコニンはtetra TMSエーテル誘導体、ヒパコニン、ベンゾイルアコニン及びベンゾイルメサコニンはtri TMSエーテル誘導体、ベンゾイルヒパコニンはbis TMSエーテル誘導体から得られる各々の基準ピーク ( $[M-OCH_3]^+$ イオン)  $m/z$  756, 742, 654, 788, 774及び686をモニタリングイオンとして、それぞれ使用した。なお、定量分析は、各アルカロイドの標準品を用いて検量線を作成し、ピーク面積法で行った。

### 3. 試料として用いたトリカブト根塊

トリカブト根塊は福島県西白河郡西郷村にて1990年12月、1991年3月、5月、6月および9月に、それぞれ採取し、室温にて十分乾燥後分析に用いた。

### 4. トリカブト根塊からの試料調整法

乾燥したトリカブト根塊を精秤後、根塊を乳鉢を用いて細粉碎した。粉碎したトリカブト根塊2 gあたり40 mLのメタノールを加え室温にて1時間激しく攪拌抽出し、遠心分離を行い、粗抽出液を得た。得られた粗抽出液の溶媒留去で得られた物質についてStas-Otto法に従い、アルカロイド画分を得た。すなわち、粗抽出液の溶媒留去後、残渣に30 mLの精製水を加え10%酒石酸水溶液を滴下することによりpHを3に調整した。激しく攪拌した後、遠心分離操作を行い上清を得た。得られた上清に60 mLのジエチルエーテルを加え激しく振盪抽出操作を行った後、水層を得た。なお、この操作は繰り返し行った。次いで水層に1 N水酸化ナトリウムを滴下しpHを11に調整した後に、クロロホルム40 mLを加えて激しく振盪抽出操作を行った後、クロロホルム層を得た。この操作は繰り返し行った。得られたクロロホルム層の1万分の1ないし10万分の1を精密にはかりとり、溶媒留去後、残渣に50  $\mu$  Lのピリジンおよび50  $\mu$  LのBSTFA (*N,O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide)を加え、密栓し室温にて1晩放置することによりアコニチン類をTMS誘導体に導き、GC/SIM分析に供した。

## 5. 血液または尿からの試料調製法

血液または尿からのアコニチン系アルカロイドの精製はBond Elut Siカートリッジを用いた固相抽出法で行った。すなわち、試料1 mLにメタノール10 mLを加えてよく混和後、3000×g、10分間遠心分離を行い上清を得た。残渣に再びメタノール10 mLを加えてよく混和しこの操作を繰り返して行った。得られた上清を合わせた後、減圧乾固し、残渣をアセトニトリル0.5 mLで溶解し、Bond Elut Siに導通した。クロロホルムおよび酢酸エチル各10 mLで洗浄後、50%ジエチルアミン-クロロホルム混合液20 mLでアコニチン系アルカロイド画分を溶出し、この溶出液を減圧乾固後、前記の方法に従いアコニチン系アルカロイドをTMS誘導体に導いた後、GC-SIM用試料とした。

## 6. トリカブト中毒患者の血液および尿試料

45歳男性が自殺目的でトリカブト根抽出液を服毒した中毒例について、採取した試料を用いた。採血は毎日一回、午前9時に行い、尿は一日分を蓄尿し、それぞれ直ちに凍結保存したものを試料として提供された。これらの各試料は分析まで-80℃で保存した。

### 【結果および考察】

#### ①GC/MSを用いたトリカブト毒定量法の確立と根塊中の毒含有量の季節変動

従来の定量法と比較して感度および特異性に優れるGC/MSを用いたアコニチン類の定量法を確立した。この定量法を用いてトリカブト根塊中のアコニチン類含有量の季節変動について検討を加えたところ、以下のことがらが判明した。

- ・同一場所から採取した同一種はアルカロイド組成がほぼ一致したが、各試料中のアコニチン類含量には大きな差異がみられた。

- ・採取時期によるアコニチン類含有量について変動を調べたところ平均含有量は一年を通じて5月が最大(4190  $\mu$ g/g)であり、9月が最小(1881  $\mu$ g/g)であった。

以上、アコニチン類含量を分析することは、犯罪等に用いられたトリカブトの産地や採取時期の特定のみならず、薬用植物の効率的利用の検討にも有用であると考えられた。また、トリカブトの根塊約1ないし2gがヒト経口致死量に相当すると推察された。

#### ②アコニチン類とその代謝産物と考えられる加水分解体の生体試料中一斉定量法を確立した。本法は抽出操作も簡便であり多検体の高感度一斉分析が可能である。(回収率：各アルカロイドで(以下同) 86～94%，SE：0.7～4.3，検量線の直線範囲50 pg～7.5 ng， $r^2=0.999$ )

#### ③トリカブト中毒患者の血液および尿を用いたトリカブト毒およびその加水分解体の体内動態の検討では以下の知見が得られた。

- ・アコニチン類の加水分解体が体液中から検出され、アコニチン類の加水分解体はその対応するアコニチン類の代謝産物の一つであることが判明した。

- ・アコニチン系アルカロイドは服毒翌日採取血清中からは検出不能となったが、尿中には持続的な排泄が

行われ、服毒7日後に検出されたアルカロイドもあった。

以上、前記一斉定量法を応用して実際のトリカブト中毒患者の血清および尿を分析したところ、尿試料により服毒数日経てもトリカブト中毒の確定診断が可能であることが示され、その濫用の抑止力になるものと考えられた。

近年の社会情勢をみると種々の毒物を濫用することによる犯罪事件が多発しており大きな問題となっている。このような事件の解決、あるいは事件を未然に防ぐ意味でも、犯罪に用いられる薬物について、中毒起因物質そのものの定性および定量法の開発のみならず、体液中からの定量法の開発、および服毒量・服毒時間の推定を目的とした毒物の生体内動態の解明が望まれる。特にアコニチン系アルカロイドに関しては、裁判化学的に前述のことは勿論であるが、一方、臨床薬学的には中毒患者の薬物療法の治療効果向上、さらに、未だ不明な点の残るアコニチン系アルカロイドの薬理作用の解明等の目的でこれらのアルカロイドの体内動態の解明が望まれる。

## 審査結果の要旨

トリカブト属植物の含有成分として現在まで約300種のアルカロイドが単離されているが、その著明なものはアコニチン系アルカロイドであり、トリカブト毒の本質である。アコニチン系アルカロイドの定量分析は、裁判化学的には事件解決に不可欠であり、トリカブトを用いた犯罪の抑止効果も期待される。一方、臨床薬学的には、トリカブトの誤食や自殺企図の際の中毒原因物質の特定と対処法の確立に有用である。アコニチン類は極めて微量で毒性を発現するため、例えば中毒患者体液中のアコニチンアルカロイドの同定及び定量には、分析感度や信頼性の優れる方法の開発が望まれていた。

本研究では、N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセタミド（BSTFA）によるトリメチルシリル（TMS）誘導体化法及びガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー（GC/MS）－選択イオン検出法による分析法を確立し、トリカブト毒であるアコニチン系アルカロイド類（アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン及びジェサコニチン）の選択的超微量定量法を確立し、従来法では分析不可能であった検出限界10 pgを達成した。さらに、確立した定量法を用いて、トリカブト根塊中のアコニチン類含有量を検討した結果、同一場所から採取した同一種のアルカロイド組成がほぼ一致すること、その含有量の季節変動は5月が最大であり、9月が最小であることを明らかにした。すなわち、本定量法を用いて試料中のアコニチン類含量を分析するとき、犯罪等に用いられたトリカブトの産地や採取時期の特定、あるいは薬用植物の品質管理への応用性が期待できることが判明した。

また、ピリジン中、触媒として1%のトリメチルクロロシランをBSTFAに添加することにより、アコニチン類、アコニン類及びベンゾイルアコニン類の単一なTMS誘導体を得ることに成功した。本TMS誘導体化法とGC/MS法を利用し、生体試料中のアコニチン類及びその加水分解生成物の一斉定量法を確立した。本法は、抽出操作も簡便であり、多検体の高感度一斉分析が可能であった。確立した定量法を用いて、トリカブト中毒患者の血液及び尿を用いたトリカブト毒及びその加水分解生成物の体内動態を検討した結果、対応するアコニチン類の加水分解生成物が体液中から検出された。体内動態の解析から、アコニチン系アルカロイドは服毒翌日の採取血清中からは検出不能であったが、尿中には持続的な排泄が行われ、服毒7日後に検出されたアルカロイドもあったことから、尿試料を用いることにより、服毒数日を経てもトリカブト中毒の確定診断が可能となり、その濫用の抑止力になるものと期待された。

以上、本研究は、トリカブト毒であるアコニチン系アルカロイドの超微量一斉分析法の開発と生体試料への応用を行ったものであり、薬学・裁判化学における貢献度は高い。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。